

製品コード MK132

研究用

TaKaRa

Human Albumin EIA Kit

説明書

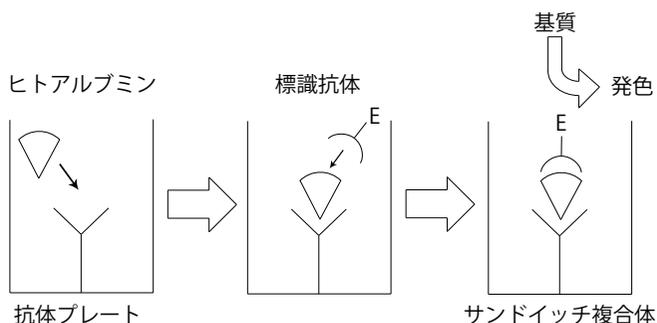
v201605

アルブミンは、血中に存在する分子量約 66,000 のタンパク質で、血中には非常に高濃度で存在しています。血液の浸透圧の調整の他、脂肪酸をはじめ種々の物質と複合体を形成するなど、物質運搬にも一役かっていることが知られています。

アルブミンは、肝臓で生合成され腎臓で濾過されますので、肝機能の状態を診断する一つの指標になっています。また近年、尿中タンパク質の増加に先立ち、微量のアルブミンが尿中に認められることが明らかになり、糖尿病性腎症の早期診断マーカーとしても注目されています。

本キットは、ヒトアルブミンに特異的なモノクローナル抗体を用いた定量キットです。ヒト血清・体液中のアルブミン含量の簡易モニタリングなどにご利用いただけます。

I. 測定原理



II. キットの内容

- | | |
|--|-----------|
| (1) Antibody Coated Microtiterplate
抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体コーティングプレート
(96 ウェル : 8 ウェル × 12 strips) | 1 plate |
| (2) Antibody-POD Conjugate (凍結乾燥品)
ペルオキシダーゼ標識抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体 | 11 ml 用 |
| (3) Standard (凍結乾燥品)
ヒトアルブミン 160 ng | 1 ml 用 |
| (4) Sample Diluent
25% ブロックエース含有 PBS (含防腐剤) | 11 ml × 2 |
| (5) Substrate Solution (TMBZ)
3, 3', 5, 5'- テトラメチルベンジジン溶液 | 12 ml |

III. キット以外に必要な試薬や器具 (主なもの)

- Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)
洗浄液成分 (10 × PBS ; 50 ml × 5 本、Tween 20 ; 3 ml) と反応停止液を含む。
- ピペット、マイクロピペットおよびチップ
- マイクロプレートリーダー (450 nm 設定で吸光度 3.5 まで測定可能なもの)

IV. 保存 4℃

V. 使用目的 ヒト血清・体液などヒトアルブミンを含有する検体中のヒトアルブミン量の測定

VI. 使用方法

1. 検体

- ・ 検体は 2～10℃に保存し、12 時間を過ぎて測定する場合は凍結保存する。
- ・ 検体の希釈は後述する測定例を参考に、高値が予想される検体を含む測定の場合は (4) Sample Diluent を用いて希釈する。
- ・ ヒト血清検体の場合、標準では 10⁶ 倍以上希釈して用いるとよい。

2. 試薬調製

- ・ 抗体プレート [(1) Antibody Coated Microtiterplate]
使用前に室温に戻してから開封する。
- ・ 標識抗体液
(2) Antibody-POD Conjugate を蒸留水 11 ml で溶解する。
溶解後 1 週間は 4℃で安定である。それ以上保存する場合には -20℃凍結する。この状態で 1 ヶ月安定である。ただし、凍結融解は一度までにとどめる。
- ・ ヒトアルブミン標準液
(3) Standard に蒸留水を 1 ml 加えて溶解し、ヒトアルブミン標準液 (160 ng/ml) を調製する。
これを (4) Sample Diluent で用時段階希釈して、80、40、20、10、5、2.5 ng/ml の各濃度の標準液を調製しておく。ゼロ濃度は (4) Sample Diluent を用いる。溶解したヒトアルブミン標準液 (160 ng/ml) は 4℃保存では 1 週間安定で、-20℃保存では 1 ヶ月安定である。
- ・ 基質液 [(5) Substrate Solution (TMBZ)]
反応に用いる前に室温にもどし、そのまま使用する。使用前に基質液が濃い青に変色していないか確認する。金属イオンと反応すると呈色するおそれがあるので、特に水道水が混入しないよう注意する。
数回に分けて使用する場合はあらかじめ必要量を取り分けるようにする。
- ・ 反応停止液 (Stop Solution)
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) の Stop Solution をそのまま用いる。
本品は硫酸を含まないペルオキシダーゼ反応停止液である。
注：粘度の高い溶液であるため投入後、プレートミキサー等で十分に攪拌してください。
- ・ 洗浄用 PBS
Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid の 10 × PBS を蒸留水で 10 倍に希釈し、十分に混合後、洗浄用 PBS として用いる。本キットで 96 ウェル分の反応を行う場合、300～500 ml 程度の洗浄用 PBS が必要である。
(注) 本キットでは Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021) に含まれている Tween 20 は使用しません。

3. 操作法

測定は二重測定で行う。

キット中の各試薬ならびにサンプルは使用前に室温にもどし、泡立てないように混和し、液を均一にしてから用いる。

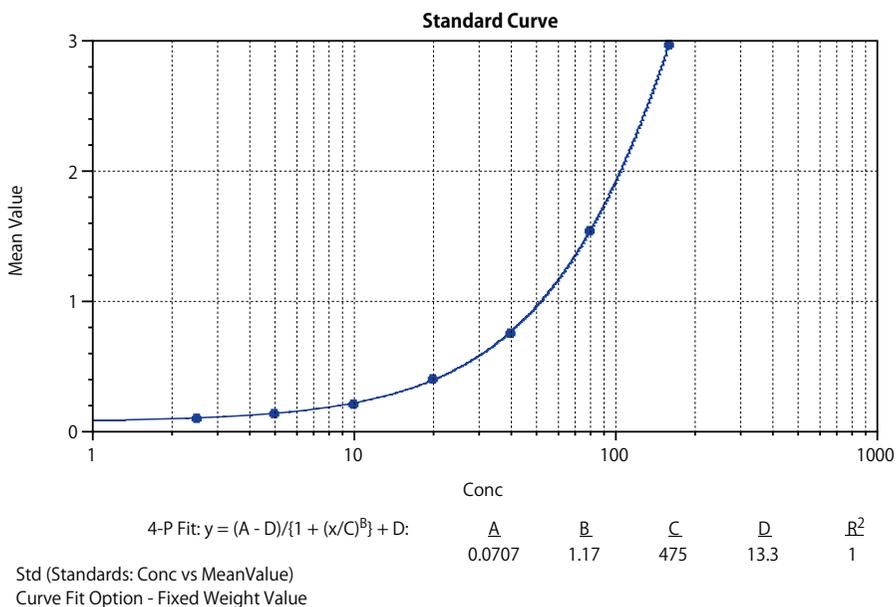
1. 各濃度のヒトアルブミン標準液およびサンプルを 100 μ l ずつマイクロピペットで各ウェルに 2 連ずつ加え、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で 2 時間反応させる。試薬ならびにサンプルはあらかじめ別の 96 穴プレートを利用して用意し、8 連ピペット等ですみやかに (5 分以内) 抗体プレートに投入する。プレート内の測定値の信頼を高めるためにも、1 列目と 12 列目とに標準液の希釈系列をおくとよい。
37 $^{\circ}$ C の加温は抗原性をそこなう恐れがあるので反応は、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で行う。(第一反応)
2. 反応液を捨て、PBS で 3 回洗浄後、標識抗体液を 100 μ l ずつ 8 連ピペット等で各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で 1 時間反応させる。(第二反応)
3. 反応液を捨て、PBS で 4 回洗浄後、(5) Substrate Solution (TMBZ) を 100 μ l ずつ各ウェルに加え、室温 (20 ~ 30 $^{\circ}$ C) で 10 ~ 15 分反応させる。(第三反応)
4. Stop Solution* を 100 μ l ずつ、(5) Substrate Solution (TMBZ) を入れた順番に各ウェルに加え、反応を停止させた後よく混和する。
* : Stop Solution は粘度の高い溶液であるため、添加後プレートミキサー等で十分混合してください。
5. 蒸留水を対照としてゼロ調整し、波長 450 nm で吸光度を測定する。発色は反応停止後 1 時間までは安定である。
6. グラフ用紙の横軸に各標準液の濃度を、縦軸に対応する吸光度をプロットして標準曲線を作成し、サンプルの吸光度から対応するヒトアルブミン濃度を読み取る。

VII. 性能

1. 標準曲線 (Human Albumin EIA Kit)

下記の標準曲線は代表的な一例である。正確な結果を得るためには、測定ごとに標準曲線を作成してください。

最少検出感度：2.5 ng/ml



ヒトアルブミン濃度 (ng/ml)	160.0	80.0	40.0	20.0	10.0	5.0	2.5	0.0
A450	2.961	1.538	0.754	0.396	0.211	0.139	0.102	0.065

(発色時間：15分)

2. 再現性

<同時再現性試験>

ヒト血清を希釈して作製した3種類の濃度コントロールを用いて再現性試験を実施した。

検体 (n = 8)	平均値 (ng/ml)	CV (%)
コントロール A	125.4	2.62
コントロール B	63.4	3.00
コントロール C	28.1	3.74

<日差再現性試験>

3日にわたり3種類の濃度コントロールの定量を行い、再現性試験を実施した。

検体 (n = 3)	平均値 (ng/ml)	CV (%)
コントロール A	129.3	7.44
コントロール B	65.3	7.94
コントロール C	28.5	4.42

3. 添加回収試験

さまざまな濃度の検体サンプルを等量ずつ混合し、予想される理論値と実測値とから回収率を調べた。

サンプル A	サンプル B	A + B (理論値)	A + B (実測値)	回収率 (%)
29.5	21.5	25.5	25.0	98
64.6	21.5	43.1	42.3	98
64.6	29.5	47.1	49.2	105
95.2	21.5	58.3	53.9	92
95.2	29.5	62.4	58.5	94
126.9	21.5	74.2	75.7	102
126.9	29.5	78.2	76.2	97
95.2	64.6	79.9	79.1	99
146.5	29.5	88.0	83.2	94
146.5	21.5	84.0	87.3	104
126.9	64.6	95.8	95.7	100
95.2	126.9	111.1	108.6	98
146.5	64.6	105.6	114.9	109
146.5	95.2	120.9	116.0	96
146.5	126.9	136.7	131.2	96

単位：ng/ml

4. 各種動物血清サンプルとの交差反応

各種動物血清アルブミンとの交差反応性を調べた。

動物血清各種* (希釈倍率)								
1 × 10 ²	1 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵	1 × 10 ²	1 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵	1 × 10 ²	1 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵
ヒト個人ドナー No. 1			ウシ			ウサギ		
ヒト個人ドナー No. 2			ウマ (オス)			ニワトリ		
ヒト個人ドナー No. 3			ブタ			ガチョウ		
ヒト個人ドナー No. 4			ヒト (プール血清)			七面鳥		
ヒト個人ドナー No. 5			イヌ			家鴨		
ヒト個人ドナー No. 6			モルモット			カニクイザル No.1		
			ラット			カニクイザル No.2		
			マウス			ヤギ		

A450 測定値

+ 4 over	0.2	0.2	0.1	ND	ND	ND	ND	ND
+ 4 over	0.2	0.1	0.3	ND	ND	ND	ND	ND
+ 4 over	0.2	0.1	+ 4 over	ND	ND	ND	ND	ND
+ 4 over	0.3	0.2	+ 4 over	0.3	0.1	ND	ND	ND
+ 4 over	0.3	0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
+ 4 over	0.2	0.1	ND	ND	ND	+ 4 over	ND	ND
			ND	ND	ND	+ 4 over	ND	ND
			ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND：A₄₅₀ 0.050 以下

+ 4 over：A₄₅₀ 4.000 以上

*：動物血清中のアルブミン標準濃度は、およそ 30 ~ 50 mg/ml と想定している。

5. 測定例：培養上清

ヒト肝癌細胞 (Hep 3B：大日本住友製薬社製) を、抗生物質を含む 10% FCS 含有 RPMI1640 培地 (シグマ社製) で培養した。その培養上清を直接または 5 倍に希釈し、ヒトアルブミン濃度を経時的に測定した。

	培地	Day 2	Day 3	Day 4	Day 7	Day 10	Day 15
原液	0.176	0.913	2.981	3.263	over	over	over
5 倍希釈	0.100	0.220	1.090	1.370	3.389	over	over

over : A450 検出限界以上

A450 測定値

6. 測定例：ヒト随時尿

ヒト随時尿を 5 ~ 5⁷ 倍希釈し、ヒトアルブミン濃度を測定した。

希釈倍率	× 5 ¹	× 5 ²	× 5 ³	× 5 ⁴	× 5 ⁵	× 5 ⁶	× 5 ⁷
Age 0 Male	over	2.963	0.908	0.226	0.08	0.063	ND
Age 69 Male	3.645	3.676	2.955	0.898	0.339	0.245	0.197

ND : A450 検出限界以下

over : A450 検出限界以上

A450 測定値

VIII. 関連製品

Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid (製品コード MK021)

Personal Microplate Washer (製品コード MK950)

Anti-Human Albumin, Monoclonal (Clone hAlb 3-7A) (製品コード M226)

Anti-Mouse Albumin, Monoclonal (Clone M-Alb 151-1) (製品コード M234)

Anti-Rat Albumin, Monoclonal (Clone R-Alb 214A-1) (製品コード M235)

Mouse Albumin EIA Kit (製品コード MK133)

Human Alpha Fetoprotein (AFP) EIA Kit (製品コード MK151)

Anti-Human Alpha Fetoprotein, Monoclonal (製品コード M225)

IX. 使用上の注意

- ロット番号の異なるキットおよび試薬を混ぜて使用しないでください。
- 保存もしくは反応中に試薬を強い光に当てないでください。
- (5) Substrate Solution (TMBZ) および Stop Solution に用いるピペット等は金属が使われていないものを用いてください。
- (5) Substrate Solution (TMBZ) および Stop Solution は手や粘膜につかないようご注意ください。
- 着色した (5) Substrate Solution (TMBZ) は使用しないでください。
- 各反応は時間、温度の影響を受けるので測定ごとに標準曲線を作成してください。
- 血液検体の取扱いには充分注意してください。

X. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

TakaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社